Aus der Universitäts-Kinderklinik Frankfurt a. M.
(Direktor: Professor Dr. v. Mettenheim)

Lane Medical Library

Über den Einfluß der Temperatur auf die Färbung von Blutausstrich-Präparaten

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Frankfurt a. M.

Vorgelegt von
Georg Wilhelm Ochs
aus Frankfurt a. M.
im April 1928

DRUCK VON JULIUS KLINKHARDT IN LEIPZIG

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Frankfurt a. M.

Referent:
Prof.: Dr. v. Mettenheim

Dekan

Prof. Dr. Schmiede[illegible]

Aus der Universitäts-Kinderklinik Frankfurt a. M.
(Direktor Prof. v. METTENHEIM).

Über den Einfluß der Temperatur auf die Färbung von Blutausstrich-Präparaten.

Von

Georg Wilhelm Ochs.

Mit 3 Kurven.

A. Einleitung und Problemstellung.

Die theoretischen Grundlagen des Färbeprozesses sind trotz zahlreicher Untersuchungen auf diesem Gebiet während der letzten Jahre bis jetzt nicht unangefochten gesichert. Noch immer stehen sich die verschiedensten Theorien unvereinbar gegenüber, die für das Verständnis des Färbevorgangs teils rein chemische, teils rein physikalische, teils mehr physiko-chemische oder kolloidchemische Vorgänge in den Vordergrund rücken und für das Zustandekommen der Färbung verantwortlich machen. EHRLICH (5) und HEIDENHAIN (7) — um nur die hauptsächlichsten Theorien kurz anzudeuten — betrachten im wesentlichen die Färbung als echte Verbindung des Farbstoffes mit dem zu färbenden Substrat im Sinne einer Salzbildung. v. MÖLLENDORFF (14) unterscheidet beim Färbungsvorgang zwei Typen: Die Durchtränkungsfärbung, die besonders mit sauren Farbstoffen zu erhalten ist, und die Niederschlagsfärbung als Grenzflächenerscheinung bei gut flockenden basischen Farbstoffen. Bei der Durchtränkungsfärbung ist nach seinen Angaben die Farbverteilung abhängig von der Dichte der Gewebsstruktur und der Diffusibilität der Farbstoffe, die Niederschlagsfärbung steht im Zusammenhang mit der Flockbarkeit des betreffenden Farbstoffes. — Während v. MÖLLENDORFF mehr in morphologischer Anschauungsweise das Problem zu klären sucht, arbeitete MICHAELIS (13) eine Theorie auf physiko-chemischen Grundlagen aus und erklärte den Färbeprozeß als Austauschadsorption, bei der ein ionisierter Anteil des zu färbenden Substrats ersetzt wird durch einen Anteil des dissoziierten Farbstoffs.

Im Gegensatz zu diesen mehr chemisch orientierten Anschauungen wiesen HOFMEISTER (10), SPIRO (28), BETHE (1), PELET-JOLIVET (22) und andere darauf hin, daß der Färbeprozeß in weitem Maße abhängig ist von der Wasserstoffionenkonzentration der Farbflüssigkeit. Aus den Untersuchungen dieser Forscher ergab sich die Tatsache, daß

saure Farbstoffe stärker durch saure, basische durch alkalische Adsorbentien, wahrscheinlich auf Grund elektrochemischer Vorgänge, adsorbiert werden, und daß sich Gewebsbestandteile mit entsprechender Ladung bei zunehmend alkalischer beziehungsweise saurer Reaktion der Farblösung immer schwächer tingieren. Die weiteren Untersuchungen von PISCHINGER (26) und MOMMSEN (17) bestätigten diese Anschauungen und ergaben, daß jeder Zellteil sowohl mit basischen als auch mit sauren Farbstoffen färbbar ist, abhängig im wesentlichen nur von der elektrostatischen Ladung des Adsorbens; bei negativer Ladung desselben werden basische Farbstoffe mit positivem Farbstoffradikal, bei positiver Ladung saure mit negativem Farbstoffradikal aufgenommen. Der Reaktionsbereich, in dem die Färbbarkeit für saure beziehungsweise für basische Farbstoffe abnimmt, stimmt überein mit dem Umschlagsbereich der kataphoretischen Wanderungsrichtung der betreffenden Substanzen, fällt also zusammen mit der Lage ihres isoelektrischen Punktes. PISCHINGER kommt zu dem Ergebnis, daß „die sauren wie die basischen Einzelfärbungen im Wesen von der Lage des isoelektrischen Punktes einer Substanz, d. i. der Ladung derselben bestimmt" (S. 197) werden und auf einem Adsorptionsvorgang beruhen. Unter dieser Voraussetzung mußten auch andere Faktoren, welche die Adsorption beeinflussen, ändernd auf die Anfärbung histologischer Objekte wirken. Ich unternahm es daher auf Veranlassung des Herrn Dr. MOMMSEN, den Einfluß der Temperatur zu untersuchen.

B. Literatur.

Der Einfluß der Temperatur auf die Adsorption bedarf noch einer umfassenden Darstellung. Die Angaben in der Literatur widersprechen sich zum Teil, oder sind doch wenigstens in ihren theoretischen Grundlagen noch nicht so weit geklärt, daß sich scheinbare Widersprüche gesetzmäßig vereinbaren ließen. Untersuchungen der Adsorption bei Farbstoffen unter dem Einfluß von Temperaturveränderungen liegen seither nur wenige vor. PELET-JOLIVET und GRAND (24) geben an, daß bei Adsorption von Methylenblau durch Tierkohle, Kieselsäure, Kaolin, Eisenoxyd mit steigender Temperatur die adsorbierten Mengen zunehmen. Dieser Befund wurde bestätigt durch SIEGRIST[1]). Auch FREUNDLICH (6) beschreibt eine Zunahme der Adsorption an der Grenzfläche von flüssig-fest mit steigender Temperatur, während die Adsorption von Gasen auf festen Körpern bei steigender Temperatur abnimmt, eine Erfahrung, die von der Technik schon seit einiger Zeit praktisch verwertet wird. — MOMMSEN (19) war es bei seinen Versuchen aufgefallen, daß die Färbung eines Blut-

[1]) Zit. nach FREUNDLICH: Kapillarchemie Leipzig 1922 S. 304.

ausstriches sich änderte, wenn die Farbschälchen von der Sonne beschienen wurden.

In folgenden Ausführungen wurde auf Grund dieses Zufallsbefundes systematisch der Einfluß der Temperatur auf den Ausfall der Färbung von Blutausstrichen untersucht. Die Ergebnisse wurden an Modellversuchen kontrolliert, bei denen Gelatineplättchen unter den gleichen Bedingungen wie die Blutausstriche gefärbt wurden.

C. Methodik.

Bei der Färbung der Blutausstriche wurde folgende Methode angewandt: Einwandfreie Objektträgerausstriche im Sinne SCHILLINGS (27) wurden 24 Stunden in einem Brutschrank bei einer Temperatur von etwa 37° getrocknet. Nach Fixation (4 Minuten in Methylalkohol) erfolgte die Färbung mit Methylenblau und Eosin. Während PISCHINGER und MOMMSEN Cyanol und Toluidinblau verwandten, kamen hier die oben genannten Farbstoffe in Anwendung, von denen ebenso wie von Cyanol und Toluidinblau angenommen werden konnte, daß sie nahezu molekular disperse Lösungen von reinem sauren resp. basischem Charakter darstellen [1]). Gefärbt wurde in einer Konzentration der Farbstoffe von 1:1000, wobei die eine Hälfte der Farbflüssigkeit aus Farblösung (1:1000), die andere aus Puffergemischen bestand. Die Puffergemische waren nach MICHAELIS (11) hergestellt, aus primärem und sekundärem Phosphat, bzw. aus Natronlauge und Essigsäure; verwandt wurde ein p_H von 4,9, 6,0, 6,8 gemessen z. T. mit der Gaskette, z. T. nach der Indikatorenmethode von MICHAELIS. Die Ausstriche wurden eine Stunde lang gefärbt in PETRIschalen, auf Streichhölzchen, die Schichtseite nach unten, um ein Sedimentieren der Farblösung nach Möglichkeit auszuschließen, und zwar bei Temperaturen von 2° (in schmelzendem Eis), bei konstanter Zimmertemperatur von 22° und im Brutschrank bei 42°. Nach der Färbung wurden die Präparate mit dem entsprechenden Puffergemisch gründlich abgespült, mit Fließpapier getrocknet und mit Ölimmersion untersucht.

Auf die gleiche Weise wurden Blutausstriche mit GIEMSAlösung gefärbt, wobei die Farblösungen entsprechend der Vorschrift zusammengesetzt waren, die MOMMSEN angegeben hat (Jahrb. f. Kinderh. Bd. CXVI. 1927 S. 269):

Giemsalösung (Grübler)	10,0
Aqu. dest.	40,0
Pufferlösung ad.	100,0

[1]) Ich spreche trotz Kenntnis des Buches von R. KELLER: „Die Elektrizität in der Zelle", 2. Aufl. 1925, von „sauren" und „basischen" Farbstoffen, da meine Untersuchung sich auf Arbeiten stützt, in denen dieses Einteilungsprinzip geläufig und bewährt ist.

Der Vergleich der Farbstärke und der Farbnüancen machte einige Schwierigkeiten. Objektive Vergleichsmöglichkeiten standen nicht zur Verfügung [1]). Ich mußte mich damit begnügen, die Präparate einfach in zwei nebeneinandergestellten Mikroskopen, die von der gleichen Lichtquelle gleichmäßig beleuchtet waren, mehrmals in Abständen mit ausgeruhtem Auge zu vergleichen und die Mittelwerte der Ergebnisse festzustellen.

Bei den Modellversuchen mit Gelatine kam folgende Methodik in Anwendung: Gelatineplättchen von einem Gewicht von 0,05 g wurden nach den oben beschriebenen Prinzipien bei dem gleichen p_H gefärbt, nach der Abspülung in den betreffenden Pufferlösungen durch Erwärmen gelöst, die Lösungen mit einer Farblösung von bekannter Konzentration und ungefähr gleicher Gelatinemenge im LEITZ-BÜRKERschen Kolorimeter verglichen und die adsorbierte Menge festgestellt. Da es nicht möglich war, bei der zur Verfügung stehenden „feinsten französischen Gelatine" eine Färbung bei 42° ohne Auflösung der Gelatine vorzunehmen, kamen nur Temperaturen von 2° (in schmelzendem Eis), 7° (Eisschrank) und 22° in Anwendung.

Es muß zugegeben werden, daß die subjektive Methode der Präparatvergleichung auf absolute Exaktheit keinen Anspruch machen kann, immerhin waren die Unterschiede in den Farbstärken und besonders in den Farbnüancen so deutlich, daß eine Verschiedenheit einwandfrei festzustellen war. Gestützt werden diese Ergebnisse durch die exakt erhaltenen Werte der Modellversuche. Es muß späteren Versuchen vorbehalten bleiben, mit anderen Mitteln und anderer Technik die Ergebnisse der Ausstrichpräparate nachzuprüfen.

D. Ergebnisse.

I a.

Für die Farbstoffe Methylenblau und Eosin konnten bei Färbung mit verschiedenem p_H die gleichen Befunde erhoben werden, wie sie BETHE, PISCHINGER und MOMMSEN für Toluidinblau und Cyanol festgestellt haben.

Die mit Methylenblau gefärbten Blutausstriche ergeben also innerhalb jedes Temperaturbereiches (schematisch gilt das gleiche für 2° und 42°) eine Zunahme der Färbung bei steigender Alkalinität der Pufferlösung, und zwar ist der Unterschied der Farbstärke anscheinend von einem p_H von 6,0 bis 6,8 stärker als der von einem p_H von 4,9 bis 6,0 — ein Ergebnis, das vollkommen die Erfahrungen bei der Färbung mit Toluidinblau bestätigt. Eine Ausnahme in der Intensitätszunahme mit steigendem p_H macht nur die Färbbarkeit des

[1]) Vgl. PFEIFFER (25). Die dort angegebenen Apparate standen mir nicht zur Verfügung. Eine Anfrage bei LEITZ-Wetzlar wurde in dem Sinne beantwortet, daß ein Apparat ähnlicher Konstruktion zur Zeit im Bau sei.

Tab. 1. Methylenblau bei 22°.

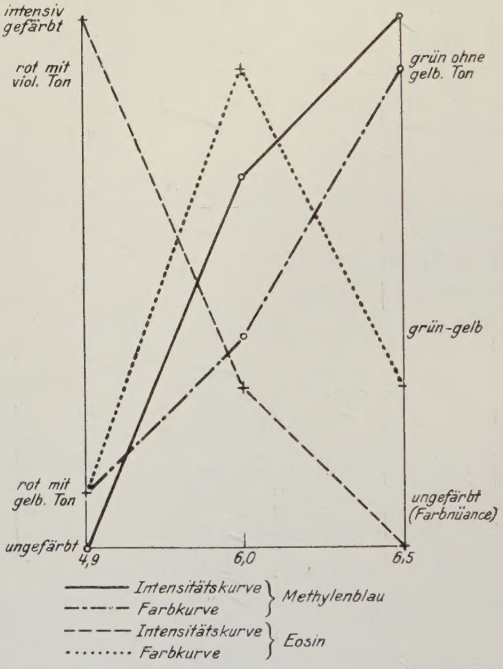
pH	Erythrozyten		neutr. Leukozyten				Lymphozyten	
	Farbe	Intens.	Plasma	Kern Farbe	Kern Int.	Gran.	Plasma	Kern
4,9	ungefärbt	—	ungef.	schwach bläulich	x	—	tiefblau Stich ins grünliche	schwach hellblau
6,0	zart grün Stich ins gelbliche	xx	ungef.	blau	xx	—	schwach hellblau dunkler Rand	blau
6,8	grünlich ohne gelbe Töne	xxxx	ganz zart hellblau	tiefblau	xxxx	+	ungef. dunkler Rand	tiefblau weniger intens als L. K.

Tab. 2. Eosin bei 22°.

pH	Erythrozyten		neutr. Leukozyten				Lymphozyten	
	Farbe	Intens.	Plasma	Kern Farbe	Kern Int.	Gran	Plasma	Kern
4,9	leucht. orangerot	xxxx	schwach rötl.	farbl. Gerüst w. Plasm.	—	—	wie neutroph. Leukozyten	
6,0	rot Stich i. viol.	xx	schwach rötl. intens. a. 4,9	farbl. Gerüst w. Plasm.	—	—	wie neutroph. Leukozyten	
6,8	rot m. gelb. Tönen	x	schwach rot	farbl. Gerüst w. Plasm.	—	—	wie neutroph. Leukozyten	

Plasmas der Lymphozyten, bei dem die Innenzone bei einem p_H von 4,9 am stärksten, bei einem p_H von 6,8 am schwächsten gefärbt ist, während die Außenzone bei allen Färbungen als dunkler Rand erscheint. Auch dieser Befund gilt für alle untersuchten Temperaturen. Noch mehr ins Auge fallend als die Intensität ist die Veränderung der Farbnüance. Während die Präparate bei einem p_H von 4,9 ungefärbte Erythrozyten, ungefärbtes Leukozytenplasma und eben blau angedeutete Kerne aufweisen, zeigen Präparate bei 6,0 zart grüne Erythrozyten mit einem Stich ins Gelbliche, ungefärbtes Leukozytenplasma und blaue Leukozytenkerne mit hellen Tönen und bei einem p_H von 6,8 stärker grüne Erythrozyten, zart graublaues Protoplasma und blaue Kerne mit dunkleren Tönen (vgl. Kurve 1).

Die mit Eosin gefärbten Präparate zeigen ihre stärkste Intensität im sauren Bereich, also bei einem p_H von 4,9, die schwächste bei einem p_H von 6,8. Die Farbkurve verläuft von leuchtend orangerot bei einem p_H von 4,9 über ein dunkleres Rot mit einem Stich ins Violette, wieder zu einem helleren Rot mit mehr gelblichen Tönen. Das Plasma der Leukozyten ist schwach rot gefärbt in allen Präparaten mit Intensitätsabnahme bei steigendem p_H und deutlichen dunkleren Farbnüancen bei einem p_H von 6,0. Vom Leukozytenkern ist nur das Gerüst gefärbt, das sich in seiner Färbbarkeit wie das Leukozyten-



Zu Kurve 1. Auf der Abszisse wurden die pH-Werte abgetragen, auf der Ordinate nach links die Farbintensität (sowohl für Methylenblau als auch für Eosin) und die Farbnüance für die Eosinfärbung. Auf der Ordinate rechts die Farbnüance für die Methylenblaufärbung.

——— Intensitätskurve } Methylenblau
—·—· Farbkurve }
— — — Intensitätskurve } Eosin
..... Farbkurve }

plasma verhält. Mit der vorliegenden Methodik konnten keine Unterschiede der Farbintensität oder der Farbnüance zwischen Leukozytenplasma und Leukozytenkerngerüst, Lymphozytenplasma und Lymphozytenkerngerüst innerhalb eines p_H-Bereiches bei konstanter

Temperatur festgestellt werden. Die erhobenen Befunde gelten wie bei der Methylenblaufärbung für alle Temperaturen.

Die Färbungen mit GIEMSA-Lösung stimmen überein mit den Resultaten von MOMMSFN (17). Der saure Farbstoff Eosin färbt bei niederem p_H stärker, der basische Farbstoff Methylenblau beziehungsweise Methylenazur bei höherem p_H. Es überwiegt also bei 4,9 die Eosinkomponente, d. h. die roten Töne, bei 6,8 die Methylenblaukomponente, d. h. die blauen Töne (vgl. Tab. 3).

Tabelle 3. Giemsalösung bei 22°.

pH	Erythrozyten		neutr. Leukozyten				Lymphozyten	
	Farbe	Intens.	Plasma	Kern		Gran.	Plasma	Kern
				Farbe	Intens.			
4,9	schwach rot-gelblich	x	schwach rötl.	schwach hellbl.	x	—	intens. violett	ganz schwach hellblau
6,0	braunrot	xx	blaß grau-rötl.	rot-violett	xx	+ blau-rötl.	blau mit hellen Tönen	rot-violett
6,8	graubraun	xxx	blaß braun-rötl.	violett mit rötl. Tönen	xxxx	++ bläul.	hellblau	violett mit rötl. Tönen

Ib.

Läßt man das p_H der Pufferlösung konstant, und variiert die Temperatur, so kann man im wesentlichen bei steigender Temperatur eine Intensitätszunahme der Färbung feststellen, die Intensitätsschwankungen jedoch sind nicht so deutlich als bei der Variation der H-Ionenkonzentrationen. Sehr viel mehr ins Auge fallend ist die Veränderung der Farbnüance (vgl. Tab. 4, 5 und 6).

Deutlich ist eine Intensitätszunahme der Eosinfärbung mit steigender Temperatur. Während bei einem p_H von 4,9 und 6,8 die Farbkurve der Erythrozyten ähnlich verläuft wie bei dem variierten p_H nämlich von rot-orange über rot mit violetten Tönen zu rot mit gelblichen Tönen, verhält sich dieselbe bei einem p_H von 6,0 etwas abweichend. Das Präparat von 22° erscheint hier heller gefärbt als das Orangerot bei 2°, das Rot bei 42° dagegen zeigt die violetten Töne. Leukozytenplasma, Leukozytenkerngerüst, Lymphozytenplasma und Lymphozytenkerngerüst verhalten sich in Intensität und Farbnüance entsprechend der Erythrozytenfärbung.

Tab. 4. Eosinfärbung bei wechselnder Temperatur. pH 4,9.

Temp.	Erythrozyten		neutr. Leukozyten				Lymphozyten	
	Farbe	Intens.	Plasma	Kern Farbe	Kern Int.	Gran.	Plasma	Kern
2°	rotorange Stich ins Gelbe	x	schwach rötlich eben anged.	Gerüst w. Plasma Kern ungef.	—	—	wie neutr. Leukozyten	
22°	rot Stich ins Viol.	xx	schwach rötlich dunkler als 2°	Gerüst w. Plasma Kern ungef.	—	—	wie neutr. Leukozyten	
42°	rot Stich ins Gelbe	xxx	rötl. Stich ins Gelbe	Gerüst w. Plasma-Kern ungef.	—	—	wie neutr. Leukozyten	
				Methylenblaufärbung				
2°	ungef.	—	ungef.	anged. Hellbl.	x	—	tiefbl. Stich ins grün-viol.	schwach hellbl.
22°	ungef.	—	ungef.	schwach hellbl.	xx	—	tief-blau	schwach hellbl.
42°	ungef.	—	ungef.	anged. hellbl.	x	—	blau schwäch. als 22°	schwach hellbl.
				Giemsafärbung				
2°	blaß rot	x	blaßrot etw. stärker als Er.	blau mit hell. Tönen	x	—	dkl.-blau	blau
22°	blaß rot m. dkl. Tönen	xx	rötl. m. dkl. Tönen	blau mit dkl. Tönen	xx	—	blau m. rot-viol. Schimmer	dkl. blau
42°	blaß rot	xxx	rot	hellblau	x	—	rot-viol.	anged. hellblau

Die Methylenblaufärbung weist in der Färbung der Erythrozyten eine stärkere Tingierung bei 22° als bei 2° auf, bei allen untersuchten H-Ionenkonzentrationen aber eine deutliche Abnahme der Farbinten-

Tab. 5. pH 6,0. Eosinfärbung.

Temp.	Erythrozyten		neutr. Leukozyten				Lymphozyten	
	Farbe	Intens.	Plasma	Kern Farbe	Kern Int.	Gran.	Plasma	Kern
2,0	orangerot	x	schwach rötlich	Gerüst w. Plasma Kern ungef.	—	—	wie neutr. Leukozyten	
22°	orangerot gelbl. Töne	xx	rötlich m. gelb. Tönen	Gerüst w. Plasma Kern ungef.	—	—	wie neutr. Leukozyten	
42°	orangerot violette Töne	xxx	rötlich m. viol. Tönen	Gerüst w. Plasma Kern ungef.	—	—	wie neutr. Leukozyten	
	Methylenblaufärbung							
2,0	schwach grün-gelbl.	x	ungef.	dkl.-blau	x	—	ungef.	dkl.-blau
22°	grün-gelb. m. gelbl. Tönen	xxx	ungef.	blau	xxx	—	ungef.	blau
42°	grün-gelbl. m. grün. Tönen	xx	zart grün-bläul.	hellblau	xx	—	blau (Rand)	zart hell-blau
	Giemsafärbung							
2°	gelb-braun	x	zart gelbl.	blau m. hell. Tönen	x	anged. grau-rötl.	blau-grünl.	blau-viol.
22°	braunrot (hell)	xx	grau-rötl.	rot-viol.	xxx	++ rötl.	blau	rot-viol.
42°	braunrot (dunkel)	xxx	bräunl.-grau	hellblau	xx	+ braun-rötl.	hellblau Rand dunkel	blau

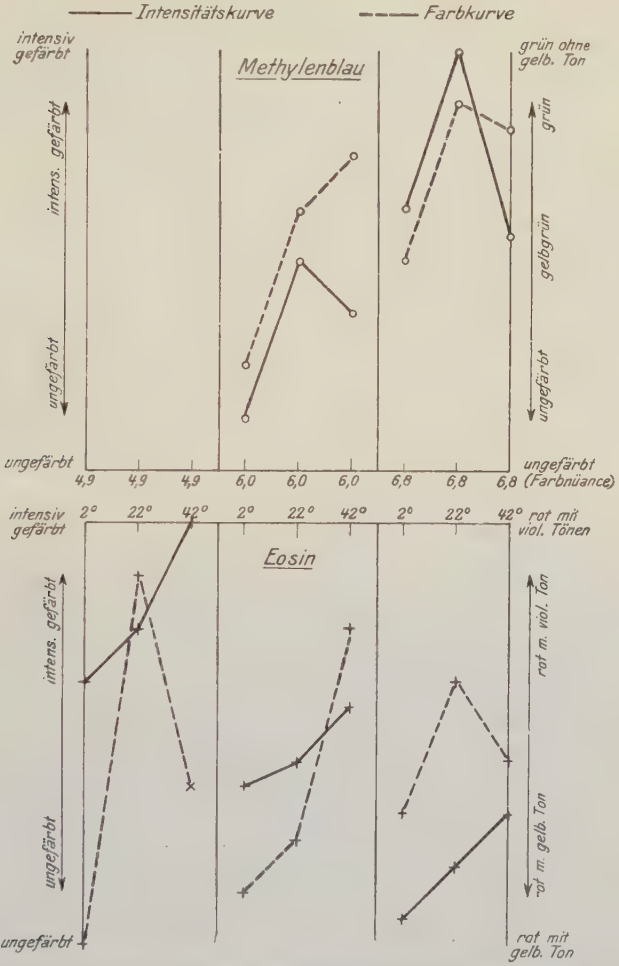
sität bei 42 °. Die Beurteilung für das p_H 4.9 ist nicht möglich, da die Erythrozyten nicht gefärbt sind. Die roten Blutkörperchen sind bei p_H 6,0 und 42 ° stärker gefärbt als bei 2 ° und schwächer als bei 22 °,

Tab. 6. pH 6,8. Eosinfärbung.

Temp.	Erythrozyten		neutr. Leukozyten				Lymphozyten	
	Farbe	Intens.	Plasma	Kern		Gran.	Plasma	Kern
				Farbe	Int.			
2°	orangerot Stich i. Gelbl.	x	zart rot	Gerüst w. Plasma Kern ungef.	—	—	wie neutr. Leukozyten	
22°	rötl. Stich i. Violette	xx	zart rot m. dkl. Tönen	Gerüst w. Plasma Kern ungef.	—	—	wie neutr. Leukozyten	
42°	hellrot	xxx	hellrot	Gerüst w. Plasma Kern ungef.	—	—	wie neutr. Leukozyten	
				Methylenblautärbung				
2°	hellgrün	xx	grau-grünl. anged.	blau m. hell. Tönen	xx	teilw. gran.	grau-grünl.	blau m. hell. Tönen
22°	grün m. dkl. Tönen	xxx	grau-blau	blau	xxx	alle Zell. gran.	grau-blau	blau
42°	schwach grüngelbl.	x	zart graugrün	hellblau	x	anged.	blau (Rand)	zart hellblau
				Giemsafärbung				
2°	zart graubraun	x	graubraun	bläul.-viol.	x	+ grau-viol.	dkl.-blau	rotviol. m. hell. Tönen
22°	graubraun rötl. Töne	xx	graubraun gelbl. Töne	rotviol.	xxx	++ rötl.	hellblau	rotviol.
42°	rötl.-braun	xxx	zart grau	hellblau m. viol. Einschl.	xx	anged. rötl.	blau-viol.	schwach hellblau

bei einem p_H von 6,8 schwächer gefärbt als bei 2° und bei 22°. Die Intensität in der Färbung des Leukozytenplasmas und der Leukozytenkerne verhält sich entsprechend der Intensitätskurve der Erythrozyten.

Auch bei der Färbung mit Methylenblau ist der Unterschied der Farbnüancen deutlicher als der der Farbintensitäten (vgl. Kurve 2).



Zu Kurve 2. Auf der Abszisse wurden die pH-Werte abgetragen. Auf der Ordinate links die Farbintensität, rechts die Farbnüance, und zwar nach oben für Methylenblau und nach unten für Eosin.

——— Intensitätskurve - - - - - - Farbkurve.

Die Färbung der Erythrozyten von Giemsa-Lösung ergibt eine Zunahme der Intensität mit steigender Temperatur. Bei allen untersuchten H-Ionenkonzentrationen ist die Färbung bei 42 ° stärker als bei 22 °, die Farbtöne der Erythrozyten bewegen sich bei einem p_H von 4,9 in roten Tönen, bei 6,0 in gelb bis rötlichbraunen, bei 6,8 in grau

bis rötlichbraunen. Entsprechend den Erythrozyten tingiert sich das Leukozytenplasma. Die Intensität der Leukozytenkerne erreicht wie bei der Methylenblaufärbung bei 22 ° ihr stärkstes Ausmaß. Bei 42 ist die Tingierung durchweg schwächer als bei 22 °. Der Kern bei 6,8 und 42 ° weist als Besonderheit in einem hellblauen Untergrund bei einzelnen Zellen violette Einschlüsse auf, ähnliche Bilder wie sie v. Möllendorff (14) (S. 34) schildert. Das Plasma der Lymphozyten zeigt in der inneren Zone eine Abnahme der Intensität von 2° zu 42° und eine Veränderung des Farbtons von dunkelblau nach rotviolett bei einem p_H von 4,9, von grünlichblau zu hellblau bei einem p_H von 6,0, von dunkelblau zu hellblau bei 6,8, wobei die Randzone deutlich blauviolett hervortritt. Der Lymphozytenkern verhält sich im wesentlichen wie der Leukozytenkern.

Ic.

Bei der Färbung der Blutpräparate — es handelt sich um Ausstriche von Blut klinisch gesunder Kinder — wurde auf das Auftreten von Granula in dem Plasma der neutrophilen Leukozyten geachtet. Nach der von Mommsen (17) (S. 61) aufgestellten Hypothese ist die alte Anschauung von Ehrlich, der die Färbung der Granula auf eine Affinität spezifischer Gruppen in der Zelle zu der Farbstoffverbindung bezog, nicht mehr haltbar. Mommsen nimmt an, daß die „neutrophilen" Elemente sich nur mit basischen Farbstoffen färben, und daß der saure Farbanteil nur dazu dient, den basischen Farbstoff in eine aufnahmefähige kolloidale Form zu bringen. Er konnte nachweisen, daß sich die reifen Granula mit Giemsa optimal färben in einer Zone von p_H 6,0 bis 7,0. Pathologische Granulationen finden sich dagegen auch schon bei niederem p_H Es war Mommsen nicht gelungen, in den Leukozyten Gesunder mit Toluidinblau allein Granula darzustellen. — Bei der Färbung mit Methylenblau konnten bei einem p_H von 6,8 bei 2 ° Zellen gefunden werden, die eine Andeutung von Granulationen zeigten, die Mehrzahl der Zellen jedoch war ungranuliert. Bei 22 ° wiesen fast alle neutrophilen Leukozyten deutliche Granulationen auf. Bei 42 ° nimmt die Färbbarkeit der Granula wieder bis zu Andeutungen ab. Es konnte also die Anschauung von Mommsen, mit basischen Farbstoffen allein neutrophile Granulationen zu färben, in dem von ihm angegebenen optimalen Bereich bestätigt werden. Mit der Giemsa-Färbung wurden dieselben Resultate erzielt, die Mommsen beschreibt: Keine Granulationen bei p_H 4,9, Granulierung bei 6,0 und 6,8, und zwar stärker bei letzterem. Ein deutlicher Einfluß der Temperatur konnte insofern festgestellt werden, als die Färbung der Granula bei 22 ° am deutlichsten ausfiel, schwächer war bei 2 ° und am schwächsten bei 42 °.

II.

Tab. 7. Adsorption von Eosin und Gelatine.

pH	Temp.	abgel. Wert	Vergleichs-konz.	absol. Wert für 0,5 g	berechneter Wert für 1,0 g
4,9	2°	12,4	1 : 20000	0,0000403	0,000806
4,9	7°	11,6	1 : 20000	0,0000431	0,000862
4,9	22°	11,0	1 : 20000	0,0000454	0,000908
6,0	2°	14,8	1 : 30000	0,0000225	0,000450
6,0	7°	13,4	1 : 30000	0,0000249	0,000498
6,0	22°	12,6	1 : 30000	0,0000264	0,000528
6,8	2°	18,2	1 : 30000	0,0000183	0,000366
6,8	7°	17,8	1 : 30000	0,0000187	0,000374
6,8	22°	16,1	1 : 30000	0,0000207	0,000414

Tab. 8. Adsorption von Methylenblau und Gelatine.

pH	Temp.	abgel. Wert	Vergleichs-konz.	absol. Wert für 0,05 g	berechneter Wert für 1,0 g
4,9	2°	11,0	1 : 75000	0,0000120	0,000246
4,9	7°	12,4	1 : 60000	0,0000135	0,000270
4,9	22°	12,8	1 : 50000	0,0000165	0,000312
6,0	2°	11,4	1 : 40000	0,0000217	0,000434
6,0	7°	10,6	1 : 40000	0,0000236	0,000472
6,0	22°	10,1	1 : 40000	0,0000247	0,000494
6,8	2°	12,4	1 : 30000	0,0000269	0,000538
6,8	7°	13,6	1 : 20000	0,0000368	0,000736
6,8	22°	10,3	1 : 30000	0,0000324	0,000648

Anm.: Die Vergleichskonzentrationen mußten öfter gewechselt werden, um zum Vergleichen die entsprechenden Farbnuancen zu erhalten.

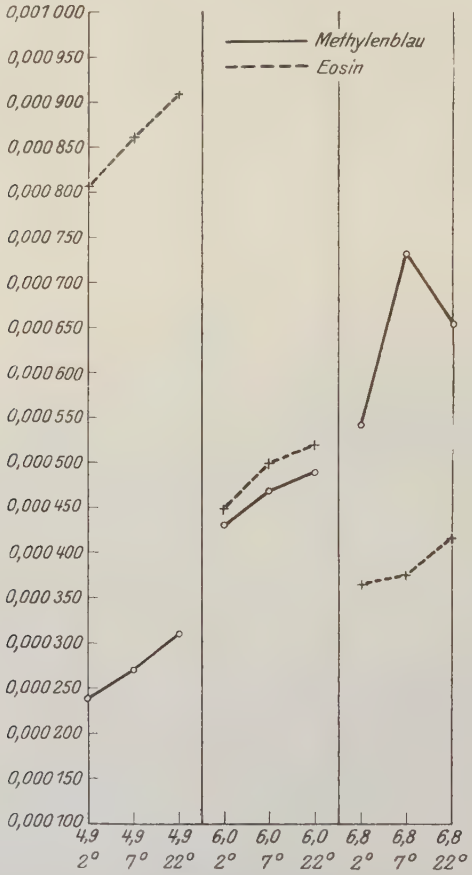
Die Modellversuche mit Gelatine und Methylenblau beziehungsweise Eosin bestätigen die Ergebnisse der Ausstrichfärbungen (vgl. Tab. 7 und 8).

Die Methylenblaukurve zeigt eine Zunahme der Farbstoffaufnahme mit wachsendem p_H und in dem Bereich von 4,9 und 6,0 auch eine Zunahme mit steigender Temperatur. Bei p_H 6,8 erreicht die Intensitätskurve bei 7° ihren Gipfel und sinkt bei 22° wieder etwas ab, ohne den Wert von 2° zu erreichen. Im Modellversuch weist die Intensitätskurve bei 22° ihre höchste Erhebung auf, im Ausstrich erscheint das Präparat bei 42° schwächer gefärbt als das bei 22°, ein Befund der leider im Modellversuch nicht nachgeprüft werden konnte. —

Die von der Gelatine aufgenommenen Eosinmengen entsprechen ebenfalls vollkommen den Ergebnissen der Ausstrichfärbung: Zu-

nahme mit wachsender Temperatur, Abnahme mit wachsendem pH (vgl. Kurve 3).

Die Modellversuche mit GIEMSA-Lösung machten insofern einige Schwierigkeiten, als es nicht möglich war, eine geeignete Vergleichs-



Zu Kurve 3. Auf der Abszisse wurden die pH-Werte abgetragen, auf der Ordinate die adsorbierten Farbmengen in g.

——— Methylenblau - - - - - - Eosin.

lösung für das Kolorimeter herzustellen. Die Färbung der Gelatine vollzieht sich in bezug auf die beiden Farbstoffkomponenten so ungleich, daß ein einheitlicher Mischton, entsprechend einem solchen bei Verdünnung von GIEMSA-Lösung mit Wasser, nicht erzielt werden konnte — eine Tatsache, die der alte, längst bekannte, einfache Versuch mit Fließpapier und GIEMSA-Lösung illustriert, wobei ja auch an Stelle einer einheitlichen Mischfärbung eine Scheidung der Farb-

komponenten auf dem Fließpapier eintritt. Um eine zahlenmäßige Vergleichsmöglichkeit zu erhalten, wurde als Vergleichsflüssigkeit für das Kolorimeter diejenige GIEMSA-Konzentration gewählt, welche die Färbung bei einem p_H von 6,8 und 7° ergibt und als 100%ig angenommen, d. h. die GIEMSA-Konzentration, die bei oberflächlichem Vergleich als die konzentrierteste erschien (vgl. Tab. 9).

Tab. 9.

pH	Temp.	abgel. Zahl	in Prozenten
4,9	2°	13,9	71,9
4,9	7°	13,5	74,1
4,9	22°	12,8	78,1
6,0	2°	12,4	80,6
6,0	7°	11,6	86,1
6,0	22°	11,3	88,5
6,8	2°	10,9	91,7
6,8	7°	10,0	100
6,8	22°	10,3	97

Die Betrachtung der kleinen Tabelle zeigt, daß die nach Auflösung der Gelatineplättchen erhaltenen Konzentrationen denen bei Gelatine-Methylenblaufärbung entsprechen.

Die Veränderungen, die die Farbstoffadsorption bei wechselnder Temperatur erfährt, sind also gesetzmäßig nicht so einfach zu fassen, daß eine Zunahme der Temperatur eine Zunahme der Adsorption bedingt, obwohl im allgemeinen diese Regel zu gelten scheint. Bei Eosinfärbung konnte ein Ansteigen der Adsorption sowohl im Ausstrichpräparat als auch im Modellversuch einwandfrei festgestellt werden. Bei der Methylenblaufärbung gilt das gleiche für die Anfärbung der Erythrozyten; es sinkt aber im Modellversuch die Adsorptionskurve bei einem p_H von 6,8 und 22° unter den Wert von 7°. Die Färbung der Leukozytenkerne zeigt bei allen untersuchten H-Ionenkonzentrationen eine geringere Intensität bei 42° als bei 2°, es treten bei 6,0 und 6,8 und 42° schwach hellblaue Töne auf gegenüber den kräftigen dunkleren Färbungen bei 22°. Vielleicht spielt hierbei die Dispersität des Farbstoffes eine Rolle: In relativ saurer Lösung (bei 6,0) ist der Farbstoff feiner dispers, bei 6,8 gröber; es wäre möglich, daß die Anfärbung unter dem Einfluß dieser Tatsache eine Abweichung von der Regel erfährt. Auch durch die Untersuchungen von PELET-JOLIVET (22) ist bekannt, daß die Adsorption von Methylenblau auf Wolle mit steigender Temperatur abnimmt. Ausnahmen wie diese sind aus der Betrachtung meiner Versuche den Allgemeinergebnissen nicht ohne weiteres einzugliedern. Vielleicht besteht die

Ansicht von PELET und ANDERSEN (23) zu Recht, daß die Veränderungen, die der Dissoziationsgrad und die Natur der Ionen mit der wechselnden Temperatur erfahren, für die Temperaturabhängigkeit ebenfalls von Wichtigkeit sind, wie die Dispersität des Farbstoffes.

Zusammenfassung.

1. Die Befunde von BETHE und seinen Schülern für die Farbstoffe Toluidinblau und Cyanol konnten für Methylenblau und Eosin bestätigt werden: Zunahme der Färbung mit Methylenblau, Abnahme mit Eosin bei steigendem p_H.
2. Mit dem basischen Farbstoff Methylenblau konnte eine Färbung von neutrophilen Granulationen bei einem p_H von 6,8 erzielt werden, was seither mit basischen Farbstoffen (Toluidinblau) nicht einwandfrei gelungen war.
3. Es wurde eine Zunahme der Eosinfärbung bei steigender Temperatur festgestellt, wobei der Unterschied der Farbnüancen deutlicher als die wechselnde Intensität die Adsorptionsdifferenzen charakterisiert. Ebenso ergab sich auch eine Zunahme der Methylenblaufärbung mit steigender Temperatur mit gewissen Ausnahmen, die näher beschrieben wurden.
4. Der Verlauf der Intensitätskurven bei Färbung mit GIEMSA-Lösung entsprach denjenigen mit Methylenblau.
5. Die angestellten Modellversuche mit Gelatine bestätigten den Befund der Ausstrichpräparate.

Zum Schlusse möchte ich Herrn Prof. v. Mettenheim für die Überlassung der Arbeit und Herrn Dr. Mommsen für seinen jederzeit freundlichst gegebenen Rat meinen besten Dank aussprechen.

Literatur.

1. BETHE, A., Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. VI. 1905.
2. BETHE, A., Wien. med. Wschr. 14. 1916.
3. BETHE, A., Biochem. Zeitschr. 127, 18. 1922.
4. BETHE, A., Biochem. Zeitschr. 126, 16. 1926.
5. EHRLICH, P., Farbanalytische Untersuchungen zur Histologie und Klinik des Blutes. Berlin. 1891.
6. FREUNDLICH, Kapillarchemie. Leipzig. 1922.
7. HEIDENHAIN, M., Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 96. 1903.
8. HEIDENHAIN, M., Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 100. 1903.
9. HOEBER, R., Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. Leipzig. 1922.
10. HOFMEISTER, F., Arch. f. exp. Path u. Pharm. 1891.
11. MICHAELIS, L., Die Wasserstoffionenkonzentration. 1. Aufl. Berlin. 1914.
12. MICHAELIS, L., Theorie des Färbeprozesses in OPPENHEIMER: Handb. d. Biochemie. Bd. 2. 1909.

13. Michaelis, L., Arch. f. mikr. Anat. Bd. 94. 1920.
14. v. Möllendorff, W. Erg. d. Anat. u. Entw. Bd. XXV. 1924.
15. v. Möllendorff, M. m. Wschr. 1923.
16. Mommsen, H., Biochem. Zeitschr. Bd. 168. 1926.
17. Mommsen, H., Fol. Haemat. Arch. Bd. XXXIII. 1927.
18. Mommsen, H., Klin. Wschr. 1926, 19.
19. Mommsen, H., Jahrb. f. Kinderh. Bd. CXVI. 1927.
20. Naegeli, Blutkrankheiten und Blutdiagnostik. 4. Aufl. 1922.
21. Pappenheim, Farbchemie. Berlin. 1901.
22. Pelet-Jolivet, Theorie des Färbeprozesses. Dresden. 1910.
23. Pelet u. Andersen, Kolloidzeitschr. 2. 210. 1908.
24. Pelet u. Grand, Kolloidzeitschr. 2. 4. 1907.
25. Pfeiffer, H., Protoplasma. Bd. 1. 1927.
26. Pischinger, Zeitschr. f. Zellforsch. u. mikr. Anat. Bd. 3. 1926.
27. Schilling, Das Blutbild und seine klinische Verwertung. Jena. 1924.
28. Spiro, C., Über physikalische und physiologische Selektion. Habilitationsschrift. Straßburg. 1897.
29. Witt, O., Färberzeitung. Heft 1. 1891.

Mein Lebenslauf.

Ich wurde geboren am 5. Januar 1901 zu Frankfurt a./M., als Sohn des Bäckermeisters Ludwig Ochs. — Ich besuchte zunächst die Adlerflycht-, später die Klinger-Oberrealschule und bestand hier das Abiturientenexamen Ostern 1920. Vom Sommersemester 1920 bis zum Wintersemester 1922 studierte ich in Freiburg Philosophie. Im Wintersemester 1922 begann ich mein medizinisches Studium in Leipzig. Die beiden ersten Semester verbrachte ich in Leipzig, die übrigen — mit Ausnahme des sechsten — in Frankfurt a./M. Die medizinische Vorprüfung legte ich in Frankfurt a./M. ab im Februar 1925. Das folgende Semester studierte ich in Greifswald. Das Staatsexamen bestand ich im Herbst 1927.

Vom 12. Dezember 1927 bis zum 1. April 1928 war ich als Medizinal-Praktikant beschäftigt an der Universitäts-Kinderklinik zu Frankfurt a./M. Seit 1. April bin ich an der medizinischen Abteilung des Hospitals zum Heiligen Geist.